

Részletes szakmai zárójelentés

(OTKA K60968 pályázat)

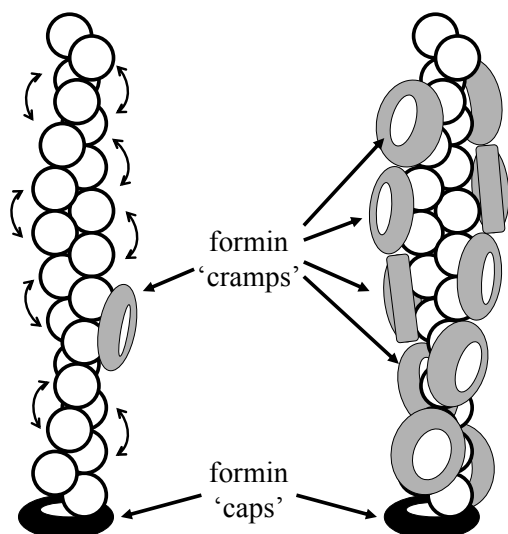
Az aktin kölcsönhatása aktin-kötő fehérjékkel és peptidekkel: fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

Az OTKA K60968 pályázat keretei között az eredeti terveinknek megfelelően tanulmányoztuk az aktin monomereknek és filamentumoknak más fehérjékkel és peptidekkel való kölcsönhatásait. A kutatások során elsősorban fluoreszcencia spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk, de az adott kérdéskörtől függően ezen módszerek eredményeit kiegészítettük elektron paramágneses rezonancia spektroszkópiai és kalorimetriai vizsgálatokkal is. Részletes vizsgálatokban jellemeztük az aktin filamentumoknak a forminokkal való kölcsönhatását, és megállapítottuk, hogy a forminok kötődésével a filamentumok szerkezete lazábbá válik. Azt is megfigyeltük, hogy a forminok által kiváltott konformációs módosulásokat a tropomiozin vagy a miozin kötődése megszünteti. Tanulmányoztunk és leírtunk továbbá egy eddig nem jellemzett formin családot, a DAAM forminokat. Ezen vizsgálataink mellett jellemeztük és értelmeztük az aktinnak a kölcsönhatását egyes mérgező toxinokkal, valamint új megfigyeléseket tettünk az aktin-miozin kölcsönhatás szerkezeti és kinetikai sajátosságait illetően is.

Az eredmények részletesebb ismertetése

A projekt keretein belül tanulmányoztuk és leírtuk egy speciális aktin-kötő fehérje családnak, a forminoknak, az aktinra kifejtett hatását. Korábbi munkánkra (Bugyi és mtsai., *J. Biol. Chem.*, 281(16), 10727-36, 2006) alapozva megállapítottuk, hogy a forminok kötődésével az aktin filamentumok szerkezete fellazul. A forminoknak az aktin konformációjára és dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatása függött a formin koncentrációtól. A függés oka az volt, hogy a forminok két eltérő módon kötődhetnek az aktinhoz. A két kötődési helyre vonatkozóan a forminok affinitása eltér, és az egyik illetve másik helyhez kötődve ellentétes hatást gyakorolnak az aktin szerkezetére (ld. mellékelt ábra). Eredményeink ismeretében megalkottunk egy olyan modellt, amely egy új, az aktin citoszkeleton szabályozásában fontos szerepet játszó mechanizmus részleteit írja le. Ezen modell állításainak a tesztelése folyamatban van. (Papp és mtsai., *Biophys. J.*, **91**(7), 2564-2572, 2006)

A forminoknak az aktin filamentumokra gyakorolt hatását további vizsgálatainkban jellemeztük elektron paramágneses rezonancia, illetve fluoreszcencia kioltási kísérletekben is. Az ezen módszerek alkalmazásával kapott eredmények összhangban voltak a korábbi fluoreszcencia spektroszkópiai megfigyelésekkel (Kupi és mtsai., *The Uncoupling of the Effects of Formins on the Local and Global Dynamics of Actin Filaments*. 2009. *Biophys. J.*, **96**(7), 2901-2911; illetve Ujfalusi és mtsai., *The Effects of Formins on the Conformation of Subdomain 1 in Actin Filaments*. 2009. *J. Photochem. Photobiol. B*, in press.)



Eredményeink ismeretében felvetődött a kérdés, hogy a forminok által az aktin filamentumokban kiváltott konformációs változásoknak van-e közvetlen biológiai jelentősége. A kérdés megválaszolása érdekében megvizsgáltuk, hogy

létezik-e olyan aktin kötő fehérje, amely az intracellulárisan forminok közreműködésével keletkező aktin filamentumokhoz kötve azok fellazult szerkezetét képes stabilizálni. Első kísérleteinkben a tropomiozin hatását tanulmányoztuk, és megállapítottuk, hogy a tropomiozin kötődésével a formin által fellazított aktin filamentumok szerkezete stabilizálódik. Ez arra utalt, hogy a forminok jelenlétében kialakuló lazább aktin szerkezetnek nincs közvetlen biológiai jelentősége, és ezen lazább konformáció csak a gyors polimerizáció miatt megjelenő nem kívánatos aktin filamentum forma. Eredményeink tudományos közleményben ismertettük (Ujfalusi és mtsai., The effect of tropomyosin on formin-bound actin filaments. 2009. *Biophys. J.*, **96**(1), 162-8). A feltevésünk további alátámasztására jelenleg vannak folyamatban azon kísérleteink, amelyekben azt vizsgáljuk, hogy képes-e a miozin is stabilizálni az aktin filamentumok szerkezetét. Első, még nem közölt megfigyeléseink szerint igen.

A pályázati munka második szakaszában francia partnerünkkel kollaborációban jellemeztük egy eddig ilyen tekintetben még nem ismert formin családnak, a DAAM forminoknak az aktinnal való kölcsönhatásait. Ezekben a kutatásokban a fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek mellett alkalmaztunk fluoreszcencia mikroszkópiai eljárásokat is. Vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk, hogy ezen formin család tagjai több olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyeket korábban már más formin családok esetében is leírtak. Eredményeinket a közelmúltban publikáltuk (Barkó és mtsai., Characterisation of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM. 2010, *J. Biol. Chem.*, in press).

Munkánk során ugyancsak kidolgoztunk egy olyan matematikai eljárást, ami lehetővé teszi fluoreszcencia kioltási kísérletek kivitelezését olyan esetekben is, amikor a kioltott fluorofóroknak egynél több, más-más oldat felőli hozzáféréssel rendelkező populációja van. Ezen módszerrel vizsgálható a fehérjék kötődő fluoreszcens ligandok kiolthatósága akkor is, amikor a ligandok egy jelentős része nem kötődik a fehérjéhez, szabadon van. Az aktin monomert kötő fehérjék csoportjába tartozó kofilinnek és profilinnek az aktinhoz történő kötődése által kiváltott szerkezeti és dinamikai változások vizsgálatára ilyen fluoreszcencia kioltás kísérletek segítségével került sor. A monomerek ATP-kötő zsebe és a zseb környezetének szerkezeti és dinamikai tulajdonságainak jellemzésére a nukleotid-kötő zsebben lévő ATP-t egy fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező ATP analóggal (ϵ -ATP) cseréltük ki. A vizsgálatok során kioltóként a töltéssel nem rendelkező akrilamidot használtuk. A *steady-state* kísérletek során meghatároztuk a Stern-Volmer állandó értékét (K_{SV}). A K_{SV} értékek az ϵ -ATP hozzáférhetőségét jellemzik, miáltal a nukleotid-kötő zseb szerkezeti változásáról és a változás molekuláris dinamikai részleteiről nyerhetünk információt. Az elvégzett kísérletek eredményeképpen megállapítható volt, hogy a kofilin bekötődését követően a K_{SV} értéke kisebb volt ($K_{SV}=0,08 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$) a kofilint nem kötő aktin monomerre kapott kioltási állandó értékéhez képest ($K_{SV}=0,28 \pm 0,06 \text{ M}^{-1}$). Ez az eltérés az ATP-kötő zsebnél az aktin-kötő fehérje hatására történő bezáródására utal. Profilin bekötődését követően ellenkező hatás volt megfigyelhető ($K_{SV}=0,8 \pm 0,08 \text{ M}^{-1}$). A nagyobb K_{SV} érték az ATP-kötő zseb felnyílására utal. Kísérleteinkkel igazolható volt, hogy mind a kofilin mind a profilin befolyásolja az aktin monomer ATP-kötő zsebének tulajdonságait. Az eredmények arra utaltak, hogy a két aktin-kötő fehérje hatása ellentétes jellegű. A kidolgozott matematika eljárást és az eredményeket tudományos közleményben ismertettük (Kardos és mtsai., The Effects of ADF/Cofilin and Profilin on the Conformation of the ATP-Binding Cleft of Monomeric Actin. 2009. *Biophys. J.*, **96**(6), 2335-2343).

Korábbi vizsgálataink folytatásaként megvizsgáltuk, hogy hogyan módosulnak az aktin filamentumok konformációs és termodinamikai tulajdonságai egyes toxinok kötődésének a

hatására. Ezen vizsgálatainkban az aktin filamentumok az ADP.P_i állapotukban voltak, amit ADP.BeF_x alkalmazásával hoztunk létre. Kalorimetriai módszerek alkalmazásával megállapítottuk, hogy az ADP.BeF_x által már stabilizált filamentumok termikus stabilitása a jasplakinolid kötődésének hatására tovább nőtt. Eredményeinket vonatkozó kalorimetriai szaklapokban közzétettük. (Kardos és mtsai., The Effect of *Jasplakinolide* on the Thermodynamic Properties of BeF_x Bound Actin Filaments. *Thermochim. Acta*, 2007, *Thermochim. Acta*, **463**, 77-80; és Vig és mtsai., Effect of Phalloidin on Filaments Polymerised from Heart Muscle ADP-Actin Monomers. *J. Thermal Anal. And Calorim.*, 2009, **3**, 721-725).

Ugyancsak vizsgáltuk és leírtuk egyes aktin izoformáknak a nukleotidokkal való kölcsönhatása során tapasztalható sajátosságait (Orbán és mtsai., Nucleotide Dependent Differences between the α -skeletal and α -cardiac Actin Isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2008, **368**(3), 696-702). Tanulmányoztuk az aktin filamentumoknak egy speciális, pontosan nem értett és értelmezett tulajdonságát, a kooperativitásukat. Az aktin filamentumokhoz kapcsolódó aktin-kötő fehérjék vagy más ligandumok szerkezeti változásokat okozhatnak. Ezen változások nem csak a kötőhely közvetlen közelében, hanem attól távolabb is jelentkezhetnek. A távolabb megjelenő konformációs módosulásokat allosztérikus kölcsönhatások okozzák. Az aktin filamentumok esetében számos esetben – például a falloidin kötődésekor - figyeltek meg hasonló, allosztérikus, vagy kooperatív kölcsönhatásokat. Munkánk során megfigyeltük, hogy a falloidin kötődése által kiváltott konformációs változások nem kooperatívak abban az esetben, ha az aktin filamentumok az ADP.P_i állapotukban vannak. Kalorimetriás kísérletek alkalmazásával ezt a megfigyelésünket különböző ADP.P_i analógok, mint ADP.BeF_x és ADP.AIF₄ esetében is megmutattuk. Ezen eredményeinket a *Biochemistry*-ben ismertettük (Orbán és mtsai., Non-Cooperative Stabilization Effect of Phalloidin on ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-Actin Filaments. *Biochemistry*, 2008, **47**(15), 4530-4.)

A debreceni és budapesti biofizikai Intézetekkel közösen tanulmányoztuk azt is, hogy hogyan módosítják egyes – a sejtbioológiai munka során gyakorta alkalmazott – detergensok az aktin polimerizációs sajátosságait. Megállapítottuk, hogy ellentétben az eddigi közvélekedéssel egyes detergenseknek az aktin polimerizációs kinetikájára gyakorolt hatása igen erős lehet. Munkánk során korrelációt írtunk le az *in vitro* körülmények között megfigyelt polimerizációs kinetikai tulajdonságok, és a megfelelően kezelt sejtekben található aktin filamentumok mennyisége között is. Eredményeink jelenleg nyomdai előkészítés alatt állnak (Ujfalusi-Pozsonyi és mtsai., The Effects of Detergents on the Polymerization Properties of Actin. 2010. *Cytometry A. in press*).

Nemzetközi együttműködések keretein belül tanulmányoztuk továbbá az aktinnak a miozinnal – az egyik legfontosabb aktin-kötő fehérjével – való kölcsönhatását is. Gyors-kinetikai módszerek alkalmazásával leírtuk az aktinnak egy nem-izom miozinnal, a XIV miozin családba tartozó *Toxoplasma gondii* Myosin D-vel való kölcsönhatásának kinetikai részleteit (Herm-Götz és mtsai., *J. Muscle Res. and Cell Motil.*, 1-13, 2006). Emellett ebben az időszakban fejeztük be az emlős izmokból származó miozin izoformák tanulmányozásának első fázisát is (Nyitrai és mtsai., *J. Mol. Biol.*, 355(3), 432-442, 2006). Ugyancsak a pályázati periódus során közzétettük azon vizsgálataink eredményeit, amelyben különböző fajokból származó emlős vázizom miozin izoformák kinetikai tulajdonságait vetettük össze (Miller és mtsai., A Variable Domain near the ATP-Binding Site in *Drosophila* Muscle Myosin Is Part of the Communication Pathway between the Nucleotide and Actin-binding Sites. *J. Mol. Biol.*, 2007, **368**(4), 1051-66).

A vázizomból származó miozinok mellett megvizsgáltuk, hogy hogyan módosítják egyes pont-mutációk a simaizom miozinok működését, ATPáz aktivitását és kinetikai tulajdonságait. Ezen kutatásainkat a rochesteri Mayo Clinic Biokémiai Intézetének kutatóival közösen valósítottuk meg, és eredményeinket közös publikációban ismertettük (Ajtai és mtsai., The C-loop is an Allosteric Actin Contact Sensor in Actomyosin. 2009. *Biochemistry*, **48(23)**, 5263-75).

Közleményjegyzék
(OTKA K60968 pályázat)

Az aktin kölcsönhatása aktin-kötő fehérjékkel és peptidekkel: fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

(A közlemények a listában az OTKA által megkövetelt formátumban, időrendben jelennek meg.)

típus	mező	tartalom
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Barkó Sz; Bugyi B; Carlier MF; Gombos R; Matusek T; Mihály J; Nyitrai M Characterisation of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM J Biol Chem in press 2010 6.355 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Ujfalusi-Pozsonyi K; Hild G; Gróf P; Gutay-Tóth Zs.; Bacsó Zs; Nyitrai M The Effects of Detergents on the Polymerization Properties of Actin Cytometry A in press 2010 3.259 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Ujfalusi Z; Barkó Sz; Hild G; Nyitrai M The Effects of Formins on the Conformation of Subdomain 1 in Actin Filaments J Photochem Photobiol B. 98(1): 7-11 2010 1.838 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Ajtai K; Halstead MF; Nyitrai M; Penheiter AR; Zheng Y; Burghardt TP The C-loop is an Allosteric Actin Contact Sensor in Actomyosin Biochemistry 48(23): 5263-5275 2009 3.633 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Ujfalusi Z; Vig A; Hild G; Nyitrai M The effect of tropomyosin on formin-bound actin filaments Biophys J 96(1): 162-168 2009 4.585 igen

Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Kardos R; Pozsonyi K; Nevalainen E; Lappalainen P; Nyitrai M; Hild G The Effects of ADF/Cofilin and Profilin on the Conformation of the ATP-Binding Cleft of Monomeric Actin Biophys J 96(6): 2335-2343 2009 4.5845 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Kupi T; Gróf P. Nyitrai M; Belágyi J The Uncoupling of the Effects of Formins on the Local and Global Dynamics of Actin Filaments Biophys J 96(7): 2901-2911 2009 4.585 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Vig A; Dudás R; Kupi T; Orbán J; Hild G; Lőrinczy D; Nyitrai M Effect of Phalloidin on Filaments Polymerised from Heart Muscle ADP-Actin Monomers J Thermal Anal and Calorim 3: 721-725 2009 1.478 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Orbán J; Lőrinczy D; Hild G; Nyitrai M Non-Cooperative Stabilization Effect of Phalloidin on ADP.BeF _x - and ADP.AIF ₄ -Actin Filaments Biochemistry 47(15): 4530-4534 2008 3.633 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Orbán J; Lőrinczy D; Nyitrai M; Hild G Nucleotide Dependent Differences between the α -skeletal and α -cardiac Actin Isoforms Biochem Biophys Res Comm 368(3): 696-702 2008 2.855 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve	Miller BM; Bloemink MJ; Nyitrai M; Bernstein SI; Geeves MA A Variable Domain near the ATP-Binding Site in Drosophila Muscle Myosin Is Part of the Communication Pathway between the Nucleotide and Actin-binding Sites J Mol Biol 368(4): 1051-66 2007

	IF OTKA támogatás feltüntetve?	5.542 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Kardos R; Vig A; Orbán J; Hild G; Nyitrai M; Lőrinczy D The Effect of <i>Jasplakinolide</i> on the Thermodynamic Properties of BeFx Bound Actin Filaments Thermochim Acta 463: 77-80 2007 1.161 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Papp G; Bugyi B; Ujfalusi Z; Barkó Sz; Hild G; Somogyi B; Nyitrai M Conformational Changes in Actin Filaments Induced by Formin Binding to the Barbed End Biophys J 91(7): 2564-2572 2006 4.585 igen
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Bugyi B; Papp G; Hild G; Lőrinczy D; Nevalainen EM; Lappalainen P; Somogyi B; Nyitrai M Formins Regulate Actin Filament Flexibility Thorough Long-Range Allosteric Interactions J Biol Chem 281(16): 10727-10736 2006 6.355 nem
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Nyitrai M; Rossi R; Adamek N; Pellegrino MA; Bottinelli R; Geeves MA What Limits the Velocity of Fast-Skeletal Muscle Contraction in Mammals? J Mol Biol 355(3): 432-442 2006 5.542 nem
Folyóiratcikk	Szerző Cím Lelőhely Közlés éve IF OTKA támogatás feltüntetve?	Herm-Götz A; Delbac F; Weiss S; Nyitrai M; Stratmann R; Tomavo S; Sibley LD; Geeves MA; Soldati D Functional and biophysical analyses of the class XIV <i>Toxoplasma gondii</i> Myosin D J Muscle Res and Cell Motil 27(2): 139-151 2006 1.721 nem